



(19) AT PATENTSCHRIFT

(II) Nr. 359 653

(73) Patentinhaber: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCHE MEDIZINISCHE PRODUKTE WIEN ÖSTERREICH

(54) Gegenstand: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES GEWEBEKLEBSTOFFES

(61) Zusatz zu Patent Nr.
(62) Ausscheidung aus:
(22)(21) Angemeldet am: 1979 02 15. 1190/79
(23) Ausstellungsriorität:

(33)(32)(31) Unionspriorität:

(42) Beginn der Patentdauer: 1980 04 15
Längste mögliche Dauer:
(45) Ausgegeben am: 1980 11 25
(22) Erfinder:
WIEN SCHWARZ OTTO DR. Braun
WIEN LINNAU YENDRA DR. Holle
WIEN LÖBLICH FRANZ ING. Spanner
WIEN SEELICH THOMAS DR. Lindner
WIEN ÖSTERREICH ÖSTERREICH ÖSTERREICH Maltes

(60) Abhängigkeit:

(56) Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

Die Erfahrung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII.

Es ist seit langem bekannt, Blutgerinnungssubstanzen zur Stillung von Blutungen bzw. für Wundversiegelungen heranzuziehen. Nach den ersten derartigen Vorschlägen wurden Fibrintampons bzw. 5 Fibrinplättchen verwendet. Während des Zweiten Weltkrieges wurden Gewebeklebungen mit Hilfe von Blutplasma vorgeschlagen.

In letzter Zeit wurde von H. Matras u.a. in der "Wiener Medizinischen Wochenschrift", 1972, Seite 517, ein Gewebeklebstoff auf Basis von Fibrinogen und Faktor XIII zur nahtlosen interfaszikulären Nerventransplantation im Tierexperiment beschrieben.

10 Eine weitere Studie stammt von Spängler u.a. in der "Wiener Klinischen Wochenschrift", 1973, Seiten 1 bis 7. Auch hier wurde in Tierversuchen die Möglichkeit aufgezeigt, mit Hilfe von Fibrinogen als Kryopräzipitat und Thrombin eine Gewebeklebung vorzunehmen.

Die bekannten Präparate haben sich noch nicht als zufriedenstellend erwiesen, weil sie die an einen Gewebeklebstoff zu stellenden Forderungen, welche die folgenden sind:

15 a) hohe Belastbarkeit der Klebungen bzw. Wundversiegelungen sowie sichere und anhaltende Blutstillung, d.h. gute Haftfähigkeit des Klebers an den Wund- bzw. Gewebsflächen, sowie hohe innere Festigkeit desselben,
b) regelbare Haltbarkeit der Klebungen im Körper,
c) vollkommene Resorbierbarkeit des Klebstoffes im Verlauf des Wundheilungsprozesses,
20 d) wundheilungsfördernde Eigenschaften,

noch nicht in ausreichendem Maße erfüllen. Dies mag teilweise darauf zurückzuführen sein, daß die für die Blutstillung notwendigen Gerinnungsfaktoren in den bekannten Präparaten nicht in einem optimalen Verhältnis zueinander vorhanden waren und auch daran, daß die fibrinolytische Aktivität im Klebebereich nur ungenügend beherrscht wurde. Es kam häufig durch enzymatische Einwirkung zu einer vorzeitigen 25 Auflösung der Gewebeklebungen.

Die Erfahrung bezweckt die Vermeidung dieser Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, einen Gewebeklebstoff auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, welcher Fibrinogen und Faktor XIII enthält, zu schaffen, der die weiter oben angeführten Voraussetzungen erfüllt.

Die Erfahrung beruht auf der Erkenntnis, daß es erforderlich ist, ein bestimmtes Verhältnis von 30 Fibrinogen zu Faktor XIII einzuhalten und daß durch eine bestimmte Menge eines Inhibitors die fibrinolytische Aktivität gehemmt wird.

Die gestellte Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs erwähnten Art erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, von 35 mindestens 80 eingestellt und der Blutplasmafraktion ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in einer Menge von 20 bis 2000 Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (KIE) pro ml sowie gegebenenfalls kälteunlösliches Globulin und/oder Albumin zugefügt werden.

Vorteilhaft wird aus einem fibrinogenhaltigen Plasma-Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumzitrat, Natriumchlorid, einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie gegebenenfalls Glycin und Glucose enthält, kältelösliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst und gegebenenfalls der gelöste, gereinigte Niederschlag durch Tieffrieren haltbar gemacht.

Bevorzugt wird das Kryopräzipitat aus humanem oder tierischem Frischplasma hergestellt, welches bei -20°C eingefroren wurde. Bei Erhöhung der Temperatur auf 0 bis 2°C wird das Kryopräzipitat 45 gewonnen und durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Pufferlösung, mit der das Kryopräzipitat behandelt wird, weist zweckmäßig einen pH-Wert von 6,0 bis 8,0 auf. Das kältelösliche Plasmaprotein wird durch Zentrifugieren unter Einhaltung einer Temperatur von 0 bis 4°C abgetrennt. Der gereinigte Niederschlag wird sodann mit der Pufferlösung so lange gewaschen, bis die gewünschten Verhältnisse von Faktor XIII zu Fibrinogen bzw. das angestrebte Verhältnis des Fibrinogens, des kälteunlöslichen Globulins und des 50 Albumins erreicht sind.

Bei einem erfindungsgemäß hergestellten Gewebeklebstoff beträgt somit das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, mindestens 80, und es ist darin ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in einer Menge von 20 bis 2000 KIE/ml enthalten.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff kälteunlösliches Globulin, welches, wie festgestellt werden konnte, die Wirksamkeit fördert.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung enthält der erfindungsgemäß hergestellte Gewebeklebstoff zusätzlich Albumin, welches eine stabilisierende Wirkung auf die Komponenten des Gewebeklebstoffes ausübt.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform sind das Fibrinogen, das kälteunlösliche Globulin und das Albumin in einem Verhältnis von 60 bis 98 : 0,5 bis 20 : 0 bis 15 zueinander enthalten und ist Faktor XIII in einer Menge von mindestens 7 Einheiten/ml enthalten.

Um die gewünschte Wirkung sicherzustellen, soll das Fibrinogen in einer Menge von mindestens 10 70 mg/ml enthalten sein.

Der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff besitzt charakteristische Vernetzbarkeitseigenschaften, welche nach der Natriumlaurylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode bestimmt sind. Der Test wird derart durchgeführt, daß nach dem Vermischen des Gewebeklebstoffes mit dem gleichen Volumen einer Lösung, enthaltend 40 µMol CaCl₂ und 15 NIH-Einheiten (US National Institute of Health-Einheiten) Thrombin/ml, die Mischung bei 37°C inkubiert wird. Der Vernetzungsgrad wird nach Stoppen der Reaktion und reduktiver Spaltung der in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken durch Zugabe eines Gemisches von Harnstoff, Natriumdodecylsulfat und β-Mercaptoäthanol durch Gelelektrophorese bestimmt. Charakteristisch für den erfindungsgemäßen Gewebeklebstoff ist eine vollständige Vernetzung der Fibrin-γ-Ketten nach 3 bis 5 min und eine mindestens 35%ige Vernetzung der Fibrin-α-Ketten nach 2 h.

Der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff weist eine universelle Anwendbarkeit auf. Er kann zum nahtlosen Verbinden von menschlichen oder tierischen Gewebe- oder Organteilen, zur Wundversiegelung und Blutstillung sowie zur Förderung von Wundheilungen verwendet werden.

Bevorzugte Anwendungsgebiete, auf welchen der erfindungsgemäß herstellbare Gewebeklebstoff erfolgreich eingesetzt werden kann, sind: Indikationen im Bereich der Hals-, Nasen-, Ohren- und Kieferchirurgie, Zahnheilkunde, Neurochirurgie, plastischen Chirurgie, allgemeinen Chirurgie, Abdominalchirurgie, Thorax- und Gefäßchirurgie, Orthopädie, Unfallchirurgie, Urologie, Ophthalmologie und Gynäkologie.

Vorteilhaft wird vor der Applikation des erfindungsgemäß erhältlichen Gewebeklebstoffes auf das zu verbindende Gewebe eine Mischung von Thrombin und Calciumchlorid dem Klebstoff zugefügt oder auf das Gewebe aufgebracht.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch das folgende Beispiel 1 näher erläutert:

178,5 l humanes, bei -20°C tiefgefrorenes Frischplasma wurden auf +2°C erwärmt. Das erhaltene Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und bei +2°C mit 8 l einer Pufferlösung, enthaltend 35 6,6 g Na₃-Citrat·2H₂O, 3,4 g NaCl, 10,0 g Glycerin, 13,0 g Glucose·1H₂O und 50000 KIE Aprotinin pro Liter, und einem pH-Wert von 6,5 behandelt und nochmals bei +2°C zentrifugiert. Die Behandlung mit der erwähnten Pufferlösung und das anschließende Zentrifugieren wurden einmal wiederholt. Der abgetrennte Niederschlag wurde durch Erwärmen auf 37°C verflüssigt.

In dem so erhaltenen Produkt war Aprotinin in einer Konzentration von 50 KIE/ml vorhanden. Das 40 Verhältnis Fibrinogen zu kälteunlöslichem Globulin zu Albumin wurde in dem Produkt mit 86,2 : 6,7 : 2,2 bestimmt. Diese Bestimmung wurde ebenfalls nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode, u.gw. a) mit einer nicht reduzierten und b) mit einer mit β-Mercaptoäthanol reduzierten Probe des 50 Gewebeklebers durchgeführt. An Faktor XIII wurden 13,8 Einheiten/ml gefunden bzw. betrug das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, 45 152. Fibrinogen war in einer Menge von 90,6 mg/ml enthalten.

Die Bestimmungen erfolgten in folgender Weise: Die Bestimmung der Faktor XIII-Einheiten erfolgte mittels eines Vernetzungstests, bei dem Faktor XIII-freies Fibrinogen als Substrat verwendet und die durch die Zugabe der unbekannten verdünnten Probe bewirkte Fibrinvernetzung als Maß für die darin enthaltene Menge an Faktor XIII diente. Eine entsprechende Eichkurve wurde mit gepooltem humanem Citratplasma erhalten, wobei per definitionem 1 ml Plasma 1 Einheit Faktor XIII enthält. Die Proteinbestimmungen erfolgten mittels der Methode nach Kjeldahl.

Der Vernetzungstest nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode ergab eine vollständige Fibrin-γ-Vernetzung nach 5 min und eine 68%ige Fibrin-α-Vernetzung nach 2 h. Das Endprodukt wurde in Endbehälter abgefüllt und zur Lagerung bei -20°C tiefgefroren.

Nach einer abgewandelten Verfahrensweise ist es auch möglich, den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor bzw. den Plasmin-Inhibitor in einem späteren Stadium zuzufügen, wie durch das folgende Beispiel 2 erläutert wird:

112,5 l humanes, bei -20°C tiefgefrorenes Frischplasma wurde auf +2°C erwärmt. Das entstandene 5 Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und bei +2°C mit 10 l einer Pufferlösung, enthaltend 6,6 g Na₃-Citrat·2H₂O, 3,4 g NaCl, 10,0 g Glycin, 13,0 g Glucose·1H₂O/l, und einem p_H-Wert von 6,5, gewaschen und nochmals bei +2°C zentrifugiert. Der abgetrennte Niederschlag wurde durch Erwärmen auf 37°C verflüssigt. Die so erhaltene Lösung wurde mit 50 KIE Aprotinin/ml versetzt.

In dem so erhaltenen Produkt wurde das Verhältnis Fibrinogen zu kälteunlöslichem Globulin zu 10 Albumin mit 91,0 : 5,3 : 1,1 bestimmt. Diese Bestimmung wurde ebenfalls nach der SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese-Methode, u.zw. a) mit einer nicht reduzierten und b) mit einer mit β-Mercaptoethanol reduzierten Probe des Gewebeklebers durchgeführt. An Faktor XIII wurden 15,7 Einheiten/ml gefunden bzw. betrug das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, 170. Fibrinogen war in einer Menge von 92,1 mg/ml enthalten.

15 Die Bestimmungen erfolgten in folgender Weise: Die Bestimmung der Faktor XIII-Einheiten erfolgte mittels eines Vernetzungstests, bei dem Faktor XIII-freies Fibrinogen als Substrat verwendet und die durch die Zugabe der unbekannten verdünnten Probe wirkte Fibrinvernetzung als Maß für die darin enthaltene Menge an Faktor XIII diente. Eine entsprechende Eichkurve wurde mit gepooltem humanem Citratplasma erhalten, wobei per definitionem 1 ml Plasma 1 Einheit Faktor XIII enthält. Die Proteinbestimmungen erfolgten mittels der Methode nach Kjeldahl.

Der Vernetzungstest nach der SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese-Methode ergab eine vollständige Fibrin-γ-Vernetzung nach 5 min und eine 87%ige Fibrin-α-Vernetzung nach 2 h. Das Endprodukt wurde in Einweg-Injektionsspritzen abgefüllt und zur Lagerung bei -20°C tiefgefroren.

25

P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII, dadurch gekennzeichnet, daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, von mindestens 80 eingestellt und der Blutplasmafraktion ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in einer Menge von 20 bis 2000 KIE/ml sowie gegebenenfalls kälteunlösliches Globulin und/oder Albumin zugefügt werden.

35 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß aus einem fibrinogenhaltigen Plasma-Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumzitrat, Natriumchlorid, einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie gegebenenfalls Glycin und Glucose enthält, kälteleistliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst wird und daß gegebenenfalls der gelöste, gereinigte Niederschlag durch Tieffrieren 40 haltbar gemacht wird.